

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts H 1017 wd	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/00363	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) 04/02/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 05/02/1999
Anmelder HILDT, Eberhard; et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00363

Feld III**WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)**

Zeile 8 nach "aufweist" neuen Absatz einfügen:

" Bevorzugt sind Hepatitis B Viruspartikel, die ein rekombinantes LHB (large surface protein) exprimieren, bei dem die PreS1 Domäne gegen die alpha5beta1 Integrin-bindende Domäne von Fibronektin ausgetauscht wurde, bzw. Hepatitis B Viruspartikel, die ein Fusionsprotein enthalten, das die PreS2 Domäne, das HBV core Protein und die alpha5beta1 Domäne umfassen, um eine veränderte gewebespezifische Anheftung der Viruspartikel zu erzielen."

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00363

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes
 IPK 7 C12N15/36 C07K14/02 C12N15/62 C07K19/00 C12N15/87

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 20221 A (YOUNG ALEXANDER T) 14. Oktober 1993 (1993-10-14) Seite 5, Zeile 16 -Seite 7, Zeile 17; Ansprüche 1-3,9,10,14-17,22,23 ---	1-4,13, 15,18
X	DMITRIEV I. ET AL.: "An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 72, Nr. 12, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 9706-9713, XP002144482 Seite 9710, Spalte 2, Zeile 26 -Seite 9712, Spalte 1, Zeile 6; Abbildung 8 --- -/-	1,2,4,9, 13,15,18

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

8. August 2000

22/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schönwasser, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00363

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 24453 A (CHIRON CORP) 10. Juli 1997 (1997-07-10) Ansprüche 1,59-61 ---	1,2,4, 13,15,18
T	OEES S. ET AL.: "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens" GENE THERAPY, Bd. 7, Nr. 9, Mai 2000 (2000-05), Seiten 750-758, XP000925809 das ganze Dokument ---	1-18
A	SCHODEL F ET AL: "Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety: I. Presentation of foreign epitopes" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 44, Nr. 1, 26. Januar 1996 (1996-01-26), Seiten 91-96, XP004036853 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument -----	1-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/00363

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Insoweit als sich der Anspruch 18 auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/ tierischen Körpers bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00363

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie			Datum der Veröffentlichung
WO 9320221	A 14-10-1993	AU 3940293	A	08-11-1993	
		CA 2133411	A	14-10-1993	
		EP 0633943	A	18-01-1995	
		JP 7505773	T	29-06-1995	
WO 9724453	A 10-07-1997	EP	0880596	A	02-12-1998

PATENT COOPERATION TREATY

D91890752

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 18 août 2001 (18.08.01)
Applicant's or agent's file reference 319-2 PCT
International application No. PCT/DE00/00363

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

GRUND, Martin
Dr Volker Vossius
Holbeinstraße 5
81679 München
ALLEMAGNE

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
04 février 2000 (04.02.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant the inventor the agent the common representative

Name and Address HUBER, Bernard Huber / Schüssler Truderinger Strasse 246 81825 München Germany	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	089/42 72 47 48	
	Facsimile No.	
	089/42 72 47 49	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person the name the address the nationality the residence

Name and Address GRUND, Martin Dr Volker Vossius Holbeinstraße 5 81679 München Germany	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	089/99 84 79-6	
	Facsimile No.	
	089/99 84 79-79	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input checked="" type="checkbox"/> other: former agent

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kari Huynh-Khuong Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 23 October 2000 (23.10.00)	
International application No. PCT/DE00/00363	Applicant's or agent's file reference H 1017 wd
International filing date (day/month/year) 04 February 2000 (04.02.00)	Priority date (day/month/year) 05 February 1999 (05.02.99)
Applicant HILDT, Eberhard et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

01 September 2000 (01.09.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Kari Huynh-Khuong Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

Translation
09/990752

2
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H 1017 st	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/00363	International filing date (day month year) 04 February 2000 (04.02.00)	Priority date (day month year) 05 February 1999 (05.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/36		
Applicant	HILDT, Eberhard	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 01 September 2000 (01.09.00)	Date of completion of this report 25 April 2001 (25.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/00363

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

the international application as originally filed
 the description:

pages _____ 1-18 _____ as originally filed
 pages _____ . filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

the claims:

pages _____ 1-18 _____ as originally filed
 pages _____ , as amended (together with any statement under Article 19)
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

the drawings:

pages _____ 1/2.2/2 _____ as originally filed
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

the sequence listing part of the description:

pages _____ , as originally filed
 pages _____ , filed with the demand
 pages _____ , filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
 the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
 the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

contained in the international application in written form.
 filed together with the international application in computer readable form.
 furnished subsequently to this Authority in written form.
 furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
 The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
 The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages _____
 the claims, Nos. _____
 the drawings, sheets/fig _____

5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/00363

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	5-8, 10-12	YES
	Claims	1-4, 9, 13-18	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims	18 (see Box VIII.3)	NO

2. Citations and explanations

(The arguments put forward by the applicant have been taken into consideration in this report.)

The available prior art makes no explicit mention of particles as per Claim 1, that is particles whose protein casing contains a cell-permeability-imparting peptide. Nevertheless, the particles described in the category "X" documents cited in the search report (WO-A-93/20221 (1), WO-A-97/24453 (2) and Dmitriev I. et al., Journal of Virology (3)) appear to be prejudicial to the novelty of the subject matter of Claims 1-4, 9 and 13-18 of the present application. Document (3) shows that the RGD motif not only functions as a heterologous binding site but also improves gene transfer (see (3), page 9710, right-hand column, last paragraph). This phenomenon suggests that the RGD motif seems to function not only as a cell-specific binding site but also as a cell-permeability-imparting peptide in accordance with the present application (see page 2, line 25 ff.). This assumption is also supported by Example 1 in the present application, in which a particle as per the invention is produced which contains only one surface protein (LHB) with a heterologous RGD binding site. Attention is drawn also to the fact that the terms used in Claim 1 ("comprising", "comprises" and "has") are understood

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/00363

to mean "containing" and not "consisting of".

Accordingly it is not possible to acknowledge Claims 1-4, 9 and 13-18 as novel at this time.

These claims thus fail to meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

The remaining claims appear to be novel over the available prior art. However, the subject matter of the said claims can be considered to represent embodiments which are obvious to a person skilled in the art and do not involve an inventive step.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. For the sake of clarity, the functional term "cell-permeability-imparting peptide" should be supplemented by a technical feature (sequence).
2. Claim 8 is incomplete and therefore unclear.
3. The phrase "or an amino acid sequence which differs therefrom by virtue of one or more amino acids" in Claim 14 makes the scope of protection of the claim unclear (PCT Article 6).
4. Claim 18 relates to subject matter which, in the opinion of the IPEA, falls under PCT Rule 67.1(iv). Consequently no expert opinion has been established regarding the industrial applicability of the subject matter of this claim (PCT Article 34(4)(a)(i)).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte at Application No
PCT/DE 00/00363A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/36 C07K14/02 C12N15/62 C07K19/00 C12N15/87

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 20221 A (YOUNG ALEXANDER T) 14 October 1993 (1993-10-14) page 5, line 16 -page 7, line 17; claims 1-3,9,10,14-17,22,23 ---	1-4,13, 15,18
X	DMITRIEV I. ET AL.: "An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 9706-9713, XP002144482 page 9710, column 2, line 26 -page 9712, column 1, line 6; figure 8 ---	1,2,4,9, 13,15,18

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

8 August 2000

22/08/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schönwasser, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/00363

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 24453 A (CHIRON CORP) 10 July 1997 (1997-07-10) claims 1,59-61 ---	1,2,4, 13,15,18
T	OEISS S. ET AL.: "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens" GENE THERAPY, vol. 7, no. 9, May 2000 (2000-05), pages 750-758, XP000925809 the whole document ---	1-18
A	SCHODEL F ET AL: "Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety: I. Presentation of foreign epitopes" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, no. 1, 26 January 1996 (1996-01-26), pages 91-96, XP004036853 ISSN: 0168-1656 the whole document ---	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Int'l Application No
PCT/DE 00/00363

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9320221	A 14-10-1993	AU 3940293	A	08-11-1993
		CA 2133411	A	14-10-1993
		EP 0633943	A	18-01-1995
		JP 7505773	T	29-06-1995
WO 9724453	A 10-07-1997	EP 0880596	A	02-12-1998

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46376
C12N 15/36, C07K 14/02, C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/87		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00363	(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Februar 2000 (04.02.00)	
(30) Prioritätsdaten: 199 04 800.2 5. Februar 1999 (05.02.99) DE	Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71)(72) Anmelder und Erfinder: HILDT, Eberhard [DE/DE]; Robert Koch Institut, Nordufer 20, D-13353 Berlin (DE).	
(72) Erfinder; und	
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOF SCHNEIDER, Peter [DE/DE]; Nördliche Auffahrtsallee 65, D-80638 München (DE).	
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).	

(54) Titel: PARTICLES FOR GENE THERAPY

(54) Bezeichnung: PARTIKEL ZUR GENTHERAPIE

(57) Abstract

The invention relates to particles comprising: a) a protein membrane with a fusion protein which comprises a virus protein, a cell-permeability-mediating peptide and a heterologous cell-specific binding site; and b) a nucleic acid which is contained in the protein membrane and presents sequences for a virus-specific packaging signal and a structural gene. The invention also relates to methods for producing such particles; means suitable for this purpose and the use of the particles in gene therapy.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Partikel, umfassend: (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfasst, und (b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung solcher Partikel und hierfür geeignete Mittel sowie die Verwendung der Partikel zur Gentherapie.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Canada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Partikel zur Gentherapie

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäure enthaltende Partikel, die gezielt an Zellen binden und in diese ihre Nukleinsäure einführen können. Ferner betrifft die Erfindung 5 Verfahren zur Herstellung solcher Partikel und hierfür geeignete Mittel sowie die Verwendung der Partikel zur Gentherapie.

10 Für eine Gentherapie ist es wichtig ein Gentransfersystem zu haben, das spezifisch ist, d.h. mit dem gewünschten Zellen erreicht und in diese Gene eingeführt werden können. Bei Leberzellen kann dies prinzipiell mit einem modifizierten Hepatitis B-Virus (HBV) als Vektor möglich, da HBV 15 leberzellspezifisch ist. Für andere Zellen, z.B. Fibroblasten, existiert jedoch kein Gentransfersystem, das befriedigende Ergebnisse liefert.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, 20 ein Gentransfersystem bereitzustellen, das spezifisch ist, d.h. mit dem gewünschten Zellen erreicht und in diese Gene eingeführt werden können.

Erfundungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den 25 Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß Nukleinsäure enthaltende Partikel, die ein Fusionsprotein aufweisen, welches ein Virus-Protein, ein 30 Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid, insbesondere ein solches der deutschen Patentanmeldung 198 50 718.6, und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, an entsprechende Zellen binden und in diese ihre Nukleinsäure einführen können. Beispielsweise hat er Nukleinsäure 35 enthaltende HBV-Partikel hergestellt, die an Fibroblasten binden und in diese ihre Nukleinsäure einführen. Hierzu hat er

die Hepatocyten-Bindungsstelle, die in der Region PreS1, insbesondere zwischen den Aminosäuren 21-47, des großen Oberflächenproteins von HBV (LHBs) vorliegt, gegen die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungsstelle von Fibronectin ausgetauscht, wobei das Zellpermeabilität-vermittelnde Peptid, das in der Region PreS2 von LHBs vorliegt, erhalten blieb. Ferner hat er Partikel mit Fibroblasten-Spezifität hergestellt, indem er das Core-Protein von HBV (HBcAg) mit der $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungsstelle von Fibronectin und dem vorstehenden Zellpermeabilität-vermittelnden Peptid verbunden hat. Des Weiteren hat er erkannt, daß die in den Partikeln enthaltene Nukleinsäure in den Zellen exprimiert wird.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, Partikel bereitzustellen, umfassend:

- (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und
- (b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist.

Der Ausdruck "Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid" umfaßt jegliche Peptide, die Substanzen, insbesondere Proteinen, eine Zellpermeabilität vermitteln können. Dies sind insbesondere jene Peptide, die in der deutschen Patentanmeldung 198 50 718.6 des Anmelders genannt sind. Besonders bevorzugt ist ein Peptid, das die folgende Aminosäure-(DNA)-Sequenz umfaßt:

P	L	S	S	I	F	S	R	I	G	D	P
CCC	ATA	TCG	TCA	ATC	TTC	TCG	AGG	ATT	GGG	GAC	CCT

Der Ausdruck "zellspezifische Bindungsstelle" umfaßt jegliche Bindungsstellen von Proteinen und sonstigen kleinen Molekülen, über welche die Proteine bzw. die Moleküle an Zellen binden

können. Beispiele solcher Bindungsstellen finden sich in Cytokinen und Wachstumsfaktoren. Ferner finden sie sich in Liganden von Hormon-, Neurotransmitter-, Blutzelloberflächen- und Integrin-Rezeptoren. Eine bevorzugte 5 Bindungsstelle ist die $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-Bindungsstelle von Fibronectin. Diese wird nachstehend mit RGD bezeichnet und umfaßt die Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat.

Der Ausdruck "Virus" umfaßt DNA- und RNA-Viren, insbesondere 10 Adenoviren, Adeno-assozierte Viren, Vaccinia-viren, Baculoviren, Hepatitis C-Viren, Hepatitis A-Viren, Influenzaviren und Hepadna-Viren. Beispiele letzterer sind HBV, WHV ("woodchuck hepatitis virus") GSHV ("ground squirrel hepatitis virus"), RBSHV ("red-bellied squirrel hepatitis virus") DHV ("Pekin duck hepatitis virus") und HHV ("heron hepatitis virus"), wobei HBV bevorzugt ist. 15

Der Ausdruck "Virus-Protein" betrifft jegliches Protein eines vorstehenden Virus, das als ganzes oder teilweise in einem 20 Fusionsprotein zusammen mit einem Zellpermeabilität-vermittelnden Peptid und einer heterologen zellspezifischen Bindungsstelle in Form eines weiteren Peptids vorliegen kann. Das Protein kann auch bereits das Zellpermeabilität-vermittelnde Peptid enthalten. Ein Beispiel für ein solches Protein ist

25 LHBs. Dieses wird wie andere Oberflächen-Proteine und Core-Proteine, z.B. HBcAg, bevorzugt. Der Ausdruck "heterolog" weist darauf hin, daß das Protein von Natur aus nicht die vorstehende zellspezifische Bindungsstelle aufweist. Günstig kann es sein, wenn die homologe, d.h. von Natur aus vorliegende Bindungsstelle des Proteins ausgeschaltet ist. 30 Besonders günstig kann es sein, wenn die homologe durch die heterologe Bindungsstelle ersetzt ist.

Der Ausdruck "Nukleinsäure" umfaßt RNA und DNA, wobei beide 35 einzelsträngig und/oder doppelsträngig sein können.

Der Ausdruck "Virus-spezifisches Verpackungssignal" weist auf eine Signalsequenz in vorstehender Nukleinsäure hin, mittels

dieser die Nukleinsäure in die Proteinhülle eines Partikels verpackt wird. Die Signalsequenz ist spezifisch für ein vorstehendes Virus. Eine bevorzugte Signalsequenz ist jene von HBV. Diese findet sich auf der HBV-DNA und wird in der 5 Literatur mit Epsilon bezeichnet.

Der Ausdruck "Struktur-Gen" umfaßt Gene, die für Polypeptide (Proteine) kodieren. Beispiele von Polypeptiden sind Tumornekrosefaktor, Interferone, Interleukine, Lymphokine, 10 Wachstumsfaktoren, Plasmaproteine, z.B. Gerinnungsfaktoren und Stoffwechselenzyme, und Rezeptoren. Insbesondere können die Polypeptide solche sein, welche die Immunogenität von Zellen steigern können. Dies können Polypeptide sein, die Tumorzellen fehlen, z.B. Cytokine, wie IL-2 und GM-CSF, und 15 kostimulatorische Moleküle, wie B7-1, Tumor-assoziierte Antigene, z.B. MAGE1, Tyrosinasen und virale Polypeptide, z.B. E7 von humanem Papillomvirus und EBNA-3-Polypeptid von Epstein-Barr-Virus. Ferner können die Polypeptide Adapter-Polypeptide, Oligomerisierungsmotive eines Polypeptids, 20 Polypeptidfragmente von Virus-Hüllpolypeptiden und Hormone sein. Ferner umfaßt der Ausdruck "Struktur-Gen" Antisense-Oligonukleotide, Peptid-Nukleinsäuren, Consensus-Sequenzen für Transkriptionsfaktoren und Ribozyme.

25 Erfindungsgemäß werden Partikel bevorzugt, die ein Fusionsprotein enthalten, das ein LHBs oder Fragmente davon und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Günstig ist es, wenn die heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, anstelle der homologen Bindungsstelle vorliegt. Besonders bevorzugt ist es, wenn das Fusionsprotein 30 die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweist.

35 Des weiteren werden Partikel bevorzugt, die ein Fusionsprotein enthalten, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid, z.B. ein solches der deutschen Patentanmeldung 198 50 718.6, insbesondere mit der vorstehend angegebenen Aminosäu-

resequenz, und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Besonders bevorzugt ist es, wenn das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche 5 Aminosäuresequenz aufweist.

Der Ausdruck "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" weist darauf hin, daß diese Aminosäuresequenz ein Fusionsprotein kennzeichnet, das vergleichbare Elemente und Funktionen wie das Fusionsprotein 10 von Fig. 1 oder Fig. 2 aufweist, sich allerdings bis zu 20 %, vorzugsweise 10 %, von der Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder 2 unterscheidet.

15 Ein erfindungsgemäßes Partikel kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Enthält das Partikel z.B. ein Fusionsprotein, das ein LHBs umfaßt, in dem die homologe durch eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, ersetzt ist, so ist ein Verfahren günstig, das folgende Verfahrensschritte 20 aufweist:

(a) Co-Transfektion von Zellen, die für ein Hepatitis B-Virus-Genom kodieren, wobei diese kein LHBs exprimieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der 25 für ein Fusionsprotein kodiert, das ein LHBs umfaßt, in dem die homologe durch eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, ersetzt ist, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus- 30 spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

(b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

Enthält das Partikel ein Fusionsprotein, das ein HBcAG, ein 35 Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid gemäß der deutschen Patentanmeldung 198 50718.6, insbesondere jenes mit vorstehender Aminosäuresequenz, und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt, so ist ein Verfahren

günstig, das folgende Verfahrensschritte umfaßt:

5 (a) Co-Transfektion von Zellen, die für eine HBV-Polymerase kodieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid gemäß der deutschen Patentanmeldung 198 50718.6, insbesondere jenes mit vorstehender Aminosäuresequenz, und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

10

15 (b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

Hinsichtlich der Ausdrücke "Expressionsvektor", "Zellen", und "Isolierung und Reinigung" wird auf nachstehende Ausführungen, insbesondere in den Beispielen, verwiesen. Die Zellen stellen ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar. Bezuglich der anderen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Fusionsprotein, das ein LHBs oder Fragmente davon und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Vorzugsweise umfaßt das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz.

25 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Fusionsprotein, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe Bindungsstelle, insbesondere RGD, umfaßt. Vorzugsweise umfaßt das Fusionsprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 2 oder eine hiervon durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz.

30

35

Hinsichtlich des Ausdrucks "eine durch eine oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine 5 Nukleinsäure, die für ein vorstehendes Fusionsprotein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

10 (a) Die DNA von Fig. 1 oder 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA, oder

(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

15 Der Ausdruck "eine durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA" weist darauf hin, daß diese DNA für ein Fusionsprotein kodiert, das vorgleichbare Elemente und Funktionen wie das Fusionsprotein von Fig. 1 oder 2 aufweist, sich allerdings von 20 der Basensequenz von Fig. 1 oder 2 derart unterscheidet, daß in der Aminosäuresequenz ein Unterschied von maximal 20 %, vorzugsweise 10 %, vorliegt.

25 Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in einem Vektor vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8, pCEV4, pCDNA3, pKSV10, pRCMV und pRK5 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

35

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101,

DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21, SG 13009 und M15pRep4, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, HepG2, CCL13 und 293, die Insektenzellen Sf9 und Sf21 und die Pflanzenzellen *Lupinus albus*.

Der Fachmann kennt Verfahren und Bedingungen Zellen mit einem, die erfindungsgemäße DNA enthaltenden Expressionsvektor zu transformieren bzw. transfizieren und die Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Virus-Protein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit dem Fusionsprotein zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können ebenfalls mit dem Fusionsprotein erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

30

- (a) ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein,
- (b) eine erfindungsgemäße DNA,
- (c) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (d) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, etc.

35

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird

auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein Gentransfer-System bereit, das spezifisch ist, d.h. mit dem gewünschte Zellen 5 erreicht und in diese Gene eingeführt werden können. Die Zellen können einzeln oder in einem Gewebe vorliegen. Ferner können die Zellen isoliert oder im Körper eines Individuums vorliegen. Somit eignet sich die vorliegende Erfindung für eine ex vivo bzw. in vivo Gentherapie von Zellen bzw. Geweben. 10 Die Anwendung der vorliegenden Erfindung kann dabei durch erfindungsgemäße Antikörper überwacht und gesteuert werden.

Somit stellt die vorliegende Erfindung einen großen Schritt 15 dar gentherapeutische Veränderungen an Zellen bzw. Geweben gezielt durchzuführen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

20 Fig. 1 zeigt die Aminosäure- und DNA-Sequenzen eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, das ein LHBs und die heterologe Bindungsstelle RGD umfaßt, wobei diese die homologe ersetzt.

25 Fig. 2 zeigt die Aminosäure- und DNA-Sequenzen eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid der vorstehenden Aminosäuresequenz und die heterologe Bindungsstelle RGD umfaßt.

30 Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung eines erfindungsgemäßen Partikels, das ein Fusionsprotein enthält, welches ein LHBs und eine heterologe Bindungsstelle umfaßt.

5 (A) Herstellung eines Expressionsvektor, der für sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs kodiert.

Hierzu wird von dem Plasmid pTKTHBV2 (vgl. Will et al., Proc. 10 Natl. Acad. Sci. 82 (1985), 891-895) ausgegangen. Dieses enthält zwei Kopien des HBV-Genoms. In einer ersten PCR wird ein Fragment von ntHBV2821 (erste Kopie) bis ntHBV2870 (zweite Kopie) amplifiziert. Der forward Primer (nt 2821-2855) weist folgende Sequenz auf: CCA TAT TCT TGG GAA CAA GAT ATC CAG CAC 15 GGG GC. Eine EcoRV-Schnittstelle ist unterstrichen. Das Triplet ACG zwischen nt 2849-2852 ersetzt das ATG-Startcodon von LHBs. Der backward Primer (nt 2877-2845) weist folgende Sequenz auf: GGA TTG CTG GTG GAA GAT ATC TGC CCC GTG CTG. Eine EcoRV-Schnittstelle ist unterstrichen. Das Triplet CGT zwischen nt 2852-2849 ersetzt das natürliche Triplet CAT. 20 Erhaltene PCR-Fragmente werden mit EcoRV verdaut und über ein präparatives 1%iges Agarosegel gereinigt. Ein Fragment der Größe von ca. 3,3 kb wird aus dem Gel eluiert und aufbewahrt.

25 In einer zweiten PCR werden ein forward Primer, der eine EcoRV-Schnittstelle gefolgt von der nachstehenden Sequenz ntHBV2860 (zweite Kopie)-2878 (erste Kopie) (CAG CAC GGG GCA GAT ATC TTC CAC CAG CAA TCC) aufweist, und ein backward Primer verwendet, der eine EcoRV Schnittstelle gefolgt von der 30 nachstehenden Sequenz ntHBV 2830-2810 (GC CCC GTG CTG GAT ATC ATC TTG TTC CCA AGA ATA TGG) aufweist. Erhaltende PCR-Fragmente werden mit EcoRV verdaut und über ein präparatives 1 % Agarose-Gel gereinigt. Ein Fragment der erwarteten Größe wird aus dem Gel eluiert und dephosphoryliert. Dieses Fragment wird mit dem vorstehenden ca. 3.3 kb großen in eine Ligasereaktion eingesetzt, wodurch der HBV-Expressionsvektor pTKTHBV2Ldef erhalten wird. Dieser Expressionsvektor kodiert für sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs. 35

(B) Herstellung eines Expressionsvektors, der für ein Fusionsprotein kodiert, welches ein LHBS und die heterologe Bindungsstelle RGD umfaßt.

5

Ausgehend von dem Plasmid pTKTHBV2 (vgl. vorstehend) wird das Fragment ntHBV2990-834 durch PCR amplifiziert. Der 5'-Primer weist folgende Sequenz auf: AAA AGA TCT GGC CGT GGC GAA GGA GCT GGA GCA TTC. Diese umfaßt eine BgIII-Schnittstelle, gefolgt von einem ATG-Startcodon und der für das Tripeptid RGD-kodierenden Sequenz. Der PreSl-spezifische Leserahmen wird genutzt. Der 3'-Primer wiest die folgende Sequenz auf: AAA AGA TCT GGT TTA AAT GTA TAC CCA AAG. Diese umfaßt eine BgIII-Schnittstelle. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit BgIII verdaut. und in den mit BgIII-gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCDNA.3 (Invitrogen) inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCRGDLHBs erhalten wird. Dieser Expressionsvektor kodiert für ein N-terminal verkürztes LHBS, das die RGD-Bindungsstelle umfaßt.

20

(C) Herstellung eines ein Struktur-Gen und ein Verpackungssignal aufweisenden Expressionsvektors

Es wird eine für das HBV-Verpackungssignal Epsilon kodierende Sequenz, z.B. ntHBV 1840-1914, mittels PCR amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wird eine EcoRV-Schnittstelle eingeführt. Die Sequenz des forward Primers lautet: CCC GAT ATC ATG TCA TCT CTT GTT CAT GTC CTA. Die Sequenz des backward Primers lautet: GGG GAT ATC GGT CGA TGT CCA TGC CCC AAA. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit EcoRV gespalten und in den mit EcoRV gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCDNA.3 (vgl. vorstehend) inseriert, wodurch der Vektor pCVPHBV erhalten wird. Dieser Vektor enthält das HBV-spezifische Verpackungssignal Epsilon.

35

Ausgehend von dem Vektor pCeGFP (Invitrogen), der für ein "green fluorescent protein" unter der Kontrolle des CMV-Promotors kodiert, wird die den CMV-Promotor und das GFP-Gen

enthaltende Sequenz mittels PCR amplifiziert. Der forward Primer hat folgende Sequenz: GGG GGA TCC CGA TGT ACG GGC CAG ATA TAC GCG TTG. Der backward Primer hat folgende Sequenz: GGG GGA TCC GCG GCC GCT TTA CTT GTA. Die verwendeten Primer 5 enthalten jeweils eine BamHI-Schnittstelle. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit BamHI gespalten und in den mit BamHI gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCVPHBV (Invitrogen) inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCVPHBV_eGFP erhalten wird. Dieser Expressionsvektor enthält das HBV-spezifische 10 Verpackungssignal Epsilon, den CMV-Promotor und eine für eGFP kodierende Sequenz.

(D) Herstellung einer Verpackungszelllinie

15 Etwa 0.8×10^6 HepG2-Zellen werden mit $4\mu\text{g}$ von pTKTHBV2Ldef (vgl. (A)) und $2\mu\text{g}$ pCDNA.3 (vgl. (B)) mittels Lipofektion transfiziert. pCDNA.3 kodiert für G418 Resistenz. 2h nach Transfektion werden die Zellen in ein 700 mg G418/l enthaltendes Medium überführt. G418 resistente Klone werden 20 nach 14d subkultiviert. Die stabile Integration von pTKTHBV2Ldef wird mittels PCR und Southern Blots nachgewiesen. Die Expression des Oberflächenproteins SHBs von HBV und von HBcAg wird mittels spezifischer Antikörper in ELISAS nachgewiesen. Es wird die Verpackungszelllinie HepG2- 25 TKTHEBV2Ldef erhalten. Diese Zelllinie exprimiert sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs.

(E) Herstellung erfindungsgemäßer Partikel

30 Etwa 0.8×10^6 Zellen der Verpackungszelllinie von (D) werden mit $3\mu\text{g}$ von pCRGDLHBS (vgl. (B)) und $3\mu\text{g}$ von pCVPHBV_eGFP (vgl. (B)) mittels Lipofektion transfiziert. 72 h nach Transfektion werden die Zellen bzw. deren Überstände gesammelt und einer PEG-Fällung unterworfen. Anschließend wird eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Es werden 35 erfindungsgemäße Partikel in reiner Form erhalten. Diese Partikel umfassen sämtliche HBV-spezifischen Proteine mit Ausnahme von LHBs, das durch ein RGD-LHBs ersetzt ist.

5 Beispiel 2: Herstellung eines erfindungsgemäßen Partikels, das ein Fusionsprotein enthält, welches ein HBCAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe Bindungsstelle umfaßt.

Es wird eine für ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid (nachstehend mit ZPP bezeichnet) kodierende DNA verwendet.

10 Diese hat folgende Sequenz: XXX AGA TCT ATG CCC ATA TCG TCA ATC TTC TCG AGG ATT GGG GAC CCT GGA TCC XXX (X bezeichnet ein beliebiges Nukleotid). Diese weist am 5'-Ende eine BgIII-Schnittstelle, gefolgt von einem ATG-Startcodon und an ihrem 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle auf. Ein doppelsträngiges 15 DNA-Molekül, das auf vorstehender Sequenz basiert, wird mit BamHI/BgIII geschnitten und in den mit BamHI-gespaltenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pCDNA.3 (vgl. vorstehend) inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCZPP erhalten wird.

20 Ferner wird der Expressionsvektor pTKTHBV2 (vgl. vorstehend) verwendet, um das Fragment nt-HBV 1861-2136 mittels PCR zu amplifizieren. Der forward-Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX GGA TCC ACT GTT CAA GCC TCC AAG CTG. Diese umfaßt eine BamHI-Schnittstelle gefolgt von der Sequenz ntHB 1861-1881.

25 Der backward Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX GAA TTC TGG ATC TTC CAA ATT AAC ACC CAC CCA. Diese umfaßt eine EcoRI-Schnittstelle gefolgt von der Sequenz ntHBV 2139-2116. In einer zweiten PCR wird das Fragment ntHBV 2140-2480 amplifiziert, das an seinem 5'-Ende mit der für das RGD-Motiv 30 kodierenden Sequenz erweitert ist. Der forward Primer umfaßt die folgende Sequenz: XXX GAA TTC CGA GGC GAC GCG TCT AGA GAC CTA GTA GTC. Diese umfaßt eine EcoRI-Schnittstelle gefolgt von der für das RGD-Motiv kodierenden Sequenz und der Sequenz ntHBV2140-2161. Der backward Primer umfaßt die folgende 35 Sequenz: XXX AAG CTT TCC CCA CCT TAT GAG TCC AAG. Diese umfaßt eine HindIII-Schnittstelle und die Sequenz ntHBV 2480-2460.

Erhaltene Fragmente beider PCRs werden mit EcoRI gespalten und

miteinander ligiert. Das Ligationsprodukt wird als Template für eine weitere PCR verwendet, wobei als forward Primer jener der ersten PCR und als backward Primer jener der zweiten PCR verwendet werden. Erhaltene PCR-Fragmente werden mit BamHI/-
5 HindIII gespalten und in den mit BamHI/HindIII-gespaltenen und dephosphorylierten Vektor pCZPP inseriert, wodurch der Expressionsvektor pCZPPHBcRGC erhalten wird. Dieser Expressionsvektor kodiert für HBcAg, das N-terminal die ZPP-Sequenz und im Bereich der Aminosäuren 79-82 die RGD-Sequenz
10 enthält.

Des weiteren werden etwa 0.8×10^6 HepG2-Zellen mittels Lipofektion mit $4 \mu\text{g}$ eines für HBV-Polymerase kodierenden Expressionsvektors und mit $2 \mu\text{g}$ pCDN3 transfiziert. Es wird auf die vorstehende Beschreibung von Beispiel 1, (D) verwiesen.
15 Es wird eine mit HepG2-HBV Pol bezeichnete Zelllinie erhalten.

Etwa 0.8×10^6 Zellen der Zelllinie HepG2-HBV Pol werden mit $3 \mu\text{g}$ von pCZPPHBc RGC und $3 \mu\text{g}$ von pCVPHBVeGFP (vgl. Beispiel 1, B)
20 mittels Lipofektion transfiziert. Es wird auf vorstehende Beschreibung von Beispiel 1, (E) verwiesen. Es werden erfindungsgemäße Partikel in reiner Form erhalten.

25 Beispiel 3: Nachweis der Expression einer in erfindungsgemäßen Partikeln vorliegender Nukleinsäure in Fibroblasten

30 Etwa 1×10^9 erfindungsgemäße Partikel von Beispiel 1 (E) bzw. Beispiel 2, werden in $100 \mu\text{l}$ 0,9 % Saline gelöst und in die Schwanzvene von balb/c Mäusen injiziert. 48 h nach Injektion wird der Soleus- und der Tibialis anterior Muskel isoliert und in einem "tissue tag" langsam eingefroren. Aus den eingefrorenen Präparaten werden Kryoschnitte angefertigt und diese unter einem Fluoreszenzmikroskop bei Blauanregung analysiert.
35

Es wird eine grüne Fluoreszenz in den Fibroblasten erhalten, was die Expression des "green fluorescent protein" zeigt.

Beispiel 4: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins

5 Es wird das erfindungsgemäße Fusionsprotein von Fig. 1 hergestellt. Hierzu wird die DNA von Fig. 1 am 5'-Ende mit einem BglII-Linker und am 3'-Ende mit einem BglII-Linker versehen und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgespalten. Das erhaltene BglII/BglII-Fragment wird in den Bam-
10 HI-gespaltenen Expressionsvektor pQE8 inseriert, so daß das Expressionsplasmid pQE8/LHBS erhalten wird. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Fusionsprotein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/LHBS wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 μ M Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid
15 wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qia-
gen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach
20 seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).
25

30 Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 5: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

35

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 wird einer 18 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine 38 kD Bande

aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepuffert
Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke werden sedimentiert,
bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-
Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-
Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten
Fusionspolypeptid werden Tiere wie folgt immunisiert:

10 Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

15 Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
20 Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein
25 Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten
30 Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-
35 Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat.

400 μ M Nitroblau-tetrazolium, 100mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

5 Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

10 Pro Immunisierung werden 40 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

15 Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans;
icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

20 Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung werden 12 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

5 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans;
10 icFA)

Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 84: 4. Immunisierung (PBS) - - -

Tag 87: Fusion

15 Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Patentansprüche

1. Partikel, umfassend:

5 (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und

(b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist.

10 2. Partikel nach Anspruch 1, wobei das Virus-Protein von einem Adenovirus, Adeno-assoziierten Virus, Vaccinia-virus, Baculovirus oder Hepadna-Virus stammt.

15 3. Partikel nach Anspruch 2, wobei das Hepadna-Virus ein Hepatitis B-Virus ist.

20 4. Partikel nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das Virus-Protein ein Oberflächenprotein ist.

5. Partikel nach Anspruch 4, wobei das Oberflächenprotein ein LHBs ist.

25 6. Partikel nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das Virus-Protein ein Core-Protein ist.

7. Partikel nach Anspruch 6, wobei das Core-Protein ein 30 HBcAg ist.

8. Partikel nach einem der Ansprüche 1-7, wobei das Zellpermeabilität-vermittelnde Peptid die folgende Aminosäuresequenz aufweist:

35 9. Partikel nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die heterologe zellspezifische Bindungsstelle RGD ist.

10. Partikel nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das Fusionsprotein jenes von Fig. 1 oder 2 ist.

5 11. Verfahren zur Herstellung des Partikels nach Anspruch 1, wobei das Fusionsprotein ein LHBs und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle enthält, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

10 (a) Co-Transfektion von Zellen, die für ein Hepatitis B-Virus-Genom kodieren, wobei diese kein LHBs exprimieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein LHBs und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

15

(b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

20 12. Verfahren zur Herstellung des Partikels nach Anspruch 1, wobei das Fusionsprotein ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle aufweist, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:

25 (a) Co-Transfektion von Zellen, die für eine HBV-Polymerase kodieren, mit einem ersten Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein kodiert, das ein HBcAg, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfaßt, und mit einem zweiten Expressionsvektor, der ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist, und

30

35 (b) Isolierung und Reinigung des Partikels.

13. Fusionsprotein, umfassend ein Virus-Protein, ein

zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle.

14. Fusionsprotein nach Anspruch 13, umfassend die
5 Aminosäuresequenz von Fig. 1 oder 2 oder eine hiervon
durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche
Aminosäuresequenz.

15. DNA, kodierend für das Fusionsprotein nach Anspruch 13.

10 16. DNA, kodierend für das Fusionsprotein nach Anspruch 14,
umfassend:

15 (a) Die DNA von Fig. 1 oder 2 oder eine hiervon durch
ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
oder

(b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten
gentischen Code verwandte DNA.

20 17. Expressionsvektor, kodierend für die DNA nach Anspruch
16.

18. Verwendung des Partikels nach einem der Ansprüche 1-10

25 zur Gentherapie von Zellen und Geweben.

1/2

MGRGDGAGAFGLGFTP
PHGGLLW
GWP
QAQ
GILE
TLP
PAN
PPP
AST
NRQ
SGR
QPT
PLS
PPL
RNTHP
QAM
QWN
STT
FH
QTL
QD
P
R
V
R
G
LY
F
P
A
G
G
S
S
G
T
V
N
P
V
P
T
T
V
S
P
I
S
I
I
F
S
R
I
G
D
P
A
L
N
M
E
N
I
T
S
G
F
L
G
P
L
L
V
L
Q
A
G
F
F
L
L
T
R
I
L
T
I
P
Q
S
L
D
S
W
W
T
S
L
N
F
L
G
G
T
T
V
C
L
G
Q
N
S
Q
S
P
T
S
N
H
S
P
T
S
C
P
P
T
C
P
G
Y
R
W
M
C
L
R
R
F
I
I
F
L
F
I
L
L
C
L
I
F
L
L
V
L
D
Y
Q
G
M
L
P
V
C
P
L
I
P
G
S
S
T
T
S
G
P
C
R
T
C
T
T
P
A
Q
G
T
S
M
Y
P
S
C
C
C
T
K
P
S
D
G
N
C
T
C
I
P
I
P
S
S
W
A
F
G
K
F
L
W
E
W
A
R
F
S
W
L
S
L
L
V
P
F
Q
W
F
V
G
L
S
P
T
V
W
L
S
V
I
W
M
M
W
Y
W
G
P
S
L
Y
S
I
L
S
P
F
L
P
L
L
P
I
F
F
C
L
W
V
Y
I

FIG. 1

2/2

atgcccataatcgtaatcttcgaggattggggaccctggatccactactgttcaagcctccaag
ctgtgccttgggtggcttgggcatggacatcgacccttataaagaattggagctactgtggag
ttactctcggtttgccttctgacttcttccttcagtcgtacgagatcttcagataccgcctcagct
ctgtatcgggaagccttagagtctcctgagcattgttacccctcaccataactgcactcaggaagca
attcttgctggggaaactaatgactctagctacctgggtgggtttaatttggaaagatccagaa
ttccgaggcgacgcgtctagagaccttagtagtcagttatgtcaacactaataatgggcctaaagtcc
aggcaactcttgcgtttcacatcttgcacttttggaaagagaaaccgttatagagatatttg
gtgtcttcggagtgtggattcgcactcctccagcttatagaccaccaaatgccctatcctatca
acacttccggaaactactgttgcgttagacgacgaggcaggtcccctagaagaactccctcgcc
cgcagacgaaggctcaatcgccgcgtcgcagaagatctcaatctcgaaacctcaatgttagtat
tcc

MPLSSIFSRIGDPTVQASKLCLGWLWMDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLDTASALYR
EALESPEHCSPHHTALRQAIILCWGELMTLATWGVVNLEDPEFRGDASRDLVVSYVNTNMGLKFRQL
LWFHISCLTFGRETVIEYLVSGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVVRRGRSPRRTPSPRR
RSQSPRRRSQSREPQC

Fig.2

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Dr. Eberhardt Hildt, Klinikum Rechts d. Isar
(B) STRASSE: Ismaninger Str.
(C) ORT: Muenchen
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 81675

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Partikel zur Gentherapie

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 19

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 199 04 800.2

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 347 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```

Met Gly Arg Gly Asp Gly Ala Gly Ala Phe Gly Leu Gly Phe Thr Pro
1 5 10 15

Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu
20 25 30

Glu Thr Leu Pro Ala Asn Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser
35 40 45

Gly Arg Gln Pro Thr Pro Leu Ser Pro Pro Leu Arg Asn Thr His Pro
50 55 60

Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Thr Leu Gln Asp
65 70 75 80

Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly
85 90 95

Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Val Ser Pro Ile Ser Ser Ile Phe
100 105 110

Ser Arg Ile Gly Asp Pro Ala Leu Asn Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly
115 120 125

```

Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr
 130 135 140
 Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu
 145 150 155 160
 Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser
 165 170 175
 Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly
 180 185 190
 Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu
 195 200 205
 Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met
 210 215 220
 Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Ser Thr Thr Ser Thr Gly
 225 230 235 240
 Pro Cys Arg Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro
 245 250 255
 Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro
 260 265 270
 Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser
 275 280 285
 Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe
 290 295 300
 Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp
 305 310 315 320
 Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu
 325 330 335
 Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 340 345

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 215 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Pro Leu Ser Ser Ile Phe Ser Arg Ile Gly Asp Pro Thr Val Gln
 1 5 10 15
 Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile Asp Pro
 20 25 30
 Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser
 35 40 45

Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu
 50 55 60

Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr
 65 70 75 80

Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr Leu Ala
 85 90 95

Thr Trp Val Gly Val Asn Leu Glu Asp Pro Glu Phe Arg Gly Asp Ala
 100 105 110

Ser Arg Asp Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys
 115 120 125

Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg
 130 135 140

Glu Thr Val Ile Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 145 150 155 160

Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 165 170 175

Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr
 180 185 190

Pro Ser Pro Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser
 195 200 205

Gln Ser Arg Glu Pro Gln Cys
 210 215

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 663 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATGCCCATAT CGTCAATCTT CTCGAGGATT GGGGACCCCTG GATCCACTAC TGTTCAAGCC	60
TCCAAGCTGT GCCTTGGGTG GCTTTGGGGC ATGGACATCG ACCCTTATAA AGAATTGGAA	120
GCTACTGTGG AGTTACTCTC GTTTTGCCCT TCTGACTTCT TTCCCTCAGT ACGAGATCTT	180
CTAGATACCG CCTCAGCTCT GTATCAGGAA GCCTTAGAGT CTCCTGAGCA TTGTTCACCT	240
CACCATACTG CACTCAGGCA AGCAATTCTT TGCTGGGGGG AACTAATGAC TCTAGCTACC	300
TGGGTGGGTG TTAATTGGAA AGATCCAGAA TTCCGAGGCG ACGCGTCTAG AGACCTAGTA	360
GTCAGTTATG TCAACACTAA TATGGGCCTA AAGTTCAAGGC AACTCTTGTG GTTTCACATT	420
TCTTGTCTCA CTTTTGGAAG AGAAACCGTT ATAGACTATT TGGTGTCTTT CGGAGTGTGG	480

ATTCGCACTC CTCCAGCTTA TAGACCACCA AATGCCCTA TCCTATCAAC ACTTCCGGAA	540
ACTACTGTTG TTAGACGACG AGGCAGGTCC CCTAGAAGAA GAACTCCCTC GCCTCGCAGA	600
CGAAGGTCTC AATGCCCGCG TCGCAGAAGA TCTCAATCTC GGGAACCTCA ATGTTAGTAT	660
TCC	663

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1047 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATGGGCCGTG GCGAAGGAGC TGGAGCATTC GGGCTGGTT TCACCCCACC GCACGGAGGC	60
CTTTTGGGGT GGAGCCCTCA GGCTCAGGGC ATACTACAAA CTTTGCCAGC AAATCCGCCT	120
CCTGCCTCCA CCAATGCCA GACAGGAAGG CAGCCTACCC CGCTGTCTCC ACCTTGAGA	180
AACACTCATC CTCAGGCCAT GCAGTGGAAAT TCCACAAACCT TTCACCAAAC TCTGCAAGAT	240
CCCAGAGTGA GAGGCCTGTA TTTCCCTGCT GGTGGCTCCA GTTCAGGAGC AGTAAACCT	300
GTTCCGACTA CTGCCTCTCC CTTATCGTCA ATCTTCTCGA GGATTGGGGA CCCTGCGCTG	360
AACATGGAGA ACATCACATC AGGATTCTA GGACCCCTTC TCGTGTACA GGCGGGTTT	420
<u>TTCTTGTGA CAAGAATCCT CACAATAACCG CAGAGTCTAG ACTCGTGGTG GACTTCTCTC</u>	<u>480</u>
AATTTCTAG GGGGAACTAC CGTGTGTCTT GGCCAAAATT CGCAGTCCCC AACCTCCAAT	540
CACTCACCAA CCTCCTGTCC TCCAACCTGT CCTGGTTATC GCTGGATGTG TCTGCGGCGT	600
TTTATCATCT TCCTCTTCAT CCTGCTGCTA TGCCTCATCT TCTTGTGGT TCTTCTGGAC	660
TATCAAGGTA TGTTGCCCGT TTGTCCTCTA ATTCCAGGAT CCTCAACCAC CAGCACGGGA	720
CCATGCCGAA CCTGCATGAC TACTGCTCAA GGAACCTCTA TGTATCCCTC CTGTTGCTGT	780
ACCAAACCTT CGGACGGAAA TTGCACCTGT ATTCCCATCC CATCATCCTG GGCTTCGGA	840
AAATTCCATAT GGGAGTGGGC CTCAGCCCGT TTCTCCTGGC TCAGTTTACT AGTCCATTT	900
GTTCAGTGGT TCGTAGGGCT TTCCCCACT GTTTGGCTTT CAGTTATATG GATGATGTGG	960
TATTGGGGGC CAAGTCTGTA CAGCATCTTG AGTCCCTTT TACCGCTGTT ACCAATTTC	1020
TTTTGTCTTT GGGTATAACAT TTAAACC	1047

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCATATTCTT GGGAAACAAGA TATCCAGCAC GGGGC

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GGATTGCTGG TGGAAGATAT CTGCCCGTG CTG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CAGCACGGGG CAGATATCTT CCACCAGCAA TCC

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GCCCGTGCT GGATATCATC TTGTTCCCAA GAATATGG

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AAAAGATCTG GCCGTGGCGA AGGAGCTGGA GCATTC

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

AAAAGATCTG GTTAAATGT ATACCAAAG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CCCGATATCA TGTCATCTCT TGTCATGTC CTA

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GGGGATATCG GTCGATGTCC ATGCCCAAA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GGGGGATCCC GATGTACGGG CCAGATATAC GCGTTG

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

GGGGGATCCG CGGCCGCTTT ACTTGTA

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

NNNAGATCTA TGCCCATATC GTCAATCTTC TCGAGGATTG GGGACCTGG ATCCNNN

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

NNNGGATCCA CTGTTCAAGC CTCCAAGCTG

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

NNNGAATTCT GGATCTTCCA AATTAACACC CACCCA

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

NNNGAATTCC GAGGCGACGC GTCTAGAGAC CTAGTAGTC

39

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

NNNAAGCTTT CCCCCACCTTA TGAGTCCAAG

30

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 27 APR 2001
WIPO

37

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts H 1017 st	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00363	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 04/02/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 05/02/1999

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
C12N15/36

Anmelder

HILDT, Eberhard; et al.

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I Grundlage des Berichts
- II Priorität
- III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 01/09/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 25.04.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter SCHEFFZYK, I Tel. Nr. +49 89 2399 8602



I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17): Beschreibung, Seiten:*

1-18 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-18 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/00363

Beschreibung, Seiten:
 Ansprüche, Nr.:
 Zeichnungen, Blatt:

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 5-8,10-12 Nein: Ansprüche 1-4,9,13-18
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche Nein: Ansprüche 1-18
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-17 Nein: Ansprüche 18: siehe SEKTION VIII/3).

2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

SEKTION V-----

(Die Argumente der Anmelderin wurden beim Abfassen des vorliegenden IVPBs berücksichtigt.)

Partikel gemäß Anspruch 1, d.h. deren Proteinhülle ein Zellpermeabilitätsvermittelndes Peptid enthält sind im zur Verfügung stehenden Stand der Technik nicht explizit erwähnt. Dennoch scheinen die Partikel, welche in den im Recherchenbericht als X-Dokumente klassifizierten Entgegenhaltungen (WO 93/20221 (1), WO 97/24453 (2) und Dmitriev I. et al. Journal of Virology (3) beschrieben sind für den Gegenstand vorliegender Ansprüche 1-4, 9, 13-18 neuheitsschädlich zu sein, denn aus (3) ist ersichtlich, dass das RGD Motif nicht nur als heterologe Bindungsstelle fungiert sondern auch den Gentransfer verbessert (siehe (3), Seite 9710, rechte Spalte, letzter Absatz). Dieses Phänomen lässt den Rückschluss zu, dass das RGD Motif offensichtlich nicht nur als zellspezifische Bindungsstelle sondern auch als Zellpermeabilitätsvermittelndes Peptid im Sinne der Anmeldung (siehe Seite 2, Zeile 25++) fungiert. Diese Annahme wird ferner durch vorliegendes Beispiel 1 gestützt, in dem ein erfindungsgemäßes Partikel hergestellt wird, welches lediglich ein Oberflächenprotein (LHB) mit einer heterologen RGD-Bindungsstelle enthält. Ferner wird festgestellt, dass der Wortlaut vorliegenden Anspruchs 1 ("umfassend", "umfasst" und "aufweist") in dem Sinne von "enthaltend" und nicht "bestehend aus", gelesen wird. Demnach kann momentan Neuheit der Ansprüche 1-4, 9, 13-18 nicht anerkannt werden. Daher erfüllen diese Ansprüche nicht die Erfordernisse der Art. 33(2)(3) PCT.

Die restlichen Ansprüche scheinen im Hinblick auf den zur Verfügung stehenden Stand der Technik neu zu sein. Der Gegenstand dieser Ansprüche kann jedoch lediglich als für einen Fachmann naheliegende Ausführungsform betrachtet werden, die auf keiner erfinderischen Tätigkeit beruht.

SEKTION VIII-----

- 1). Der funktionelle Begriff "Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid" sollte aus Gründen der Klarheit durch ein technisches Merkmal (Sequenz) ergänzt werden.
- 2). Anspruch 8 ist unvollständig und damit unklar.
- 3). Der im Anspruch 14 verwendete Begriff "oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz" macht den Schutzmfang dieses Anspruchs unklar (Art. 6 PCT).
- 4). Der Anspruch 18 bezieht sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieses Anspruchs kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).



(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C12N 15/36, C07K 14/02, C12N 15/62, C07K 19/00, C12N 15/87		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46376 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. August 2000 (10.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00363 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Februar 2000 (04.02.00)		(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(30) Prioritätsdaten: 199 04 800.2 5. Februar 1999 (05.02.99) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: HILDT, Eberhard [DE/DE]; Robert Koch Institut, Nordufer 20, D-13353 Berlin (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 16. November 2000 (16.11.00)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HOF SCHNEIDER, Peter [DE/DE]; Nördliche Auffahrtsallee 65, D-80638 München (DE).		(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).	

(54) Title: PARTICLES FOR GENE THERAPY

(54) Bezeichnung: PARTIKEL ZUR GENTHERAPIE

(57) Abstract

The invention relates to particles comprising: a) a protein membrane with a fusion protein which comprises a virus protein, a cell-permeability-mediating peptide and a heterologous cell-specific binding site; and b) a nucleic acid which is contained in the protein membrane and presents sequences for a virus-specific packaging signal and a structural gene. Hepatitis B virus particles expressing a recombinant large surface protein are preferred, whereby the PreS1 domain is exchanged for the alpha5beta1 integrin binding domain of fibronectin, or the Hepatitis B virus particles contain a fusion protein that includes the PreS2 domain, the HBV core protein and the alpha5beta1 domain, in order to achieve modified tissue-specific attachment. The invention also relates to methods for producing such particles, means suitable for this purpose and the use of the particles in gene therapy.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Partikel, umfassend: (a) eine Proteinhülle mit einem Fusionsprotein, das ein Virus-Protein, ein Zellpermeabilität-vermittelndes Peptid und eine heterologe zellspezifische Bindungsstelle umfasst, und (b) eine in der Proteinhülle vorliegende Nukleinsäure, die Sequenzen für ein Virus-spezifisches Verpackungssignal und ein Struktur-Gen aufweist. Bevorzugt sind Hepatitis B Viruspartikel, die ein rekombinantes LHB (large surface protein) exprimieren, bei dem die PreS1 Domäne gegen die alpha5beta1 Integrin-bindende Domäne von Fibronektin ausgetauscht wurde, bzw. Hepatitis B Viruspartikel, die ein Fusionsprotein enthalten, das die PreS2 Domäne, das HBV core Protein und die alpha5beta1 Domäne umfassen um eine veränderte gewebespezifische Anheftung der Viruspartikel zu erzielen.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int'l. Aktenzeichen
PCT/DE 00/00363

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/36 C07K14/02 C12N15/62 C07K19/00 C12N15/87

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprästoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprästoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 20221 A (YOUNG ALEXANDER T) 14. Oktober 1993 (1993-10-14) Seite 5, Zeile 16 -Seite 7, Zeile 17; Ansprüche 1-3, 9, 10, 14-17, 22, 23	1-4, 13, 15, 18
X	DMITRIEV I. ET AL.: "An Adenovirus Vector with Genetically Modified Fibers Demonstrates Expanded Tropism via Utilization of a Coxsackievirus and Adenovirus Receptor-Independent Cell Entry Mechanism" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 72, Nr. 12, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 9706-9713, XP002144482 Seite 9710, Spalte 2, Zeile 26 -Seite 9712, Spalte 1, Zeile 6; Abbildung 8 ---	1, 2, 4, 9, 13, 15, 18

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

8. August 2000

22/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Schönwasser, D

1

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 24453 A (CHIRON CORP) 10. Juli 1997 (1997-07-10) Ansprüche 1,59-61 ---	1,2,4, 13,15,18
T	OEES S. ET AL.: "Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens" GENE THERAPY, Bd. 7, Nr. 9, Mai 2000 (2000-05), Seiten 750-758, XP000925809 das ganze Dokument ---	1-18
A	SCHODEL F ET AL: "Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety: I. Presentation of foreign epitopes" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 44, Nr. 1, 26. Januar 1996 (1996-01-26), Seiten 91-96, XP004036853 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument -----	1-18

INTERNATIONALER RECHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zu einer Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/00363

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9320221 A	14-10-1993	AU	3940293 A	08-11-1993
		CA	2133411 A	14-10-1993
		EP	0633943 A	18-01-1995
		JP	7505773 T	29-06-1995
WO 9724453 A	10-07-1997	EP	0880596 A	02-12-1998